

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : G03F 7/00, 7/20, 7/20		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/58293
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 23. Dezember 1998 (23.12.98)
(21) Internationales Aktenzeichen:	PCT/EP98/03657		
(22) Internationales Anmeldedatum:	18. Juni 1998 (18.06.98)		
(30) Prioritätsdaten:	197 26 634.7 18. Juni 1997 (18.06.97)	DE	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BIOTOOLS - INSTITUT FÜR COMPUTERINTE- GRIERTES BIOENGINEERING GMBH [DE/DE]; Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).			(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BRETER, Holger [DE/DE]; Falkenberger Chaussee 46, D-13053 Berlin (DE). JENTSCH, Winfried [DE/DE]; Weißenseer Weg 8, D-10367 Berlin (DE).			Veröffentlicht Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.
(74) Anwälte: GULDE, Klaus, W. usw.; Lützowplatz 11-13, D-10785 Berlin (DE).			

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR IMMOBILIZING MACROMOLECULES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR IMMOBILISIERUNG VON MAKROMOLEKÜLEN

(57) Abstract

The invention relates to a method and a device for immobilizing macromolecules according to the generic part of claims 1 and 19, 20, 21 and 22. The aim of the invention is to enable light induced, addressable immobilization of bio-macromolecules on extremely small surface elements. This is done by immobilizing macromolecules on a solid phase involving photoactivation of corresponding functional groups of the solid phase and coupling of reaction-capable groups of bio-macromolecules contained in a solution and the solid phase. The invention is characterized in that the immobilization reaction is photoactivated by miniaturizing the effect of the light on the surface of the solid phase, whereby addressable control of the effect of the light on the surface occurs according to a given model.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Immobilisierung von Makromolekülen gemäß den Oberbegriffen der Ansprüche 1 und 19, 20, 21 und 22. Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, lichtinduzierte adressierbare Immobilisierungen von Biomakromolekülen auf extrem kleinen Oberflächenelementen zu ermöglichen. Die Lösung der Aufgabe erfolgt mit einer Immobilisierung von Makromolekülen an eine feste Phase durch Photoaktivierung entsprechender funktioneller Gruppen der festen Phase und Kopplung an reaktionsfähige Gruppen der in Lösung befindlichen Biomakromoleküle an die feste Phase, dadurch gekennzeichnet, daß die Photoaktivierung der Immobilisierungsreaktion durch Miniaturisierung der Lichteinwirkung auf die Oberfläche der festen Phase durchgeführt wird, wobei eine adressierbare Steuerung der Lichteinwirkung auf die Oberfläche nach vorgegebenem Muster erfolgt.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolci	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun			PT	Portugal		
CN	China	KR	Republik Korea	RO	Rumänien		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SG	Singapur		
EE	Estland	LR	Liberia				

Verfahren und Vorrichtung zur Immobilisierung von Makromolekülen

5

10

Beschreibung

15 Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Immobilisierung von Makromolekülen gemäß den Oberbegriffen der Ansprüche 1 und 19, 20, 21 und 22.

20 Immobilisierungsverfahren von Biomakromolekülen an festen Phasen unter Ausnutzung von Lichtenergie zur Freisetzung reaktiver funktioneller Gruppen sind bekannt. So werden in der DE 34 35 744 A1 Trägermaterialien zur Verwendung für Immunbestimmungen beschrieben, die auf ihrer Oberfläche kovalent gebundene photoaktivierbare Moleküle aufweisen. Zur Herstellung dieser Trägermaterialien werden hier sogenannte heterobifunktionelle oder homobifunktionelle Verbindungen eingesetzt. Die auch als Brückenzweck bezeichneten Verbindungen sind mit einer funktionellen Gruppe kovalent an der festen Phase gebunden, während die zweite funktionelle Gruppe durch Photoaktivierung mit entsprechenden Biomakromolekülen gekoppelt werden kann.

Als Trägermaterialien werden Kugeln, Mikrotiterplatten oder Röhrchen aus Kunststoff verwendet. Kunststoffoberflächen dieser Formkörper bzw. Behältnisse werden mit den Brückenzählern wie zum Beispiel Lomant's Reagenz

II, N-Succinimidyl-6-(4'-azido-2'-nitrophenylamino)-hexanoat behandelt. Das Lomant's Reagenz II geht mit der Kunststoffoberfläche eine kovalente Bindung ein. Nach entsprechender Aktivierung kann die zweite funktionelle Gruppe mit, wie hier vorgesehen ist, Antigenen, Allergenen oder Antikörpern reagieren.

Die hier beschriebenen Träger eignen sich nicht zur miniaturisierten Immobilisierung von Biomakromolekülen.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, lichtinduzierte adressierbare Immobilisierungen von Biomakromolekülen auf extrem kleinen Oberflächenelementen zu ermöglichen.

Die Lösung der Aufgabe erfolgt mit den kennzeichnenden Merkmalen der Ansprüche 1, 19, 20, 21 und 22.

Vorteilhafte Weiterbildungen sind in den Unteransprüchen angegeben.

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht Biomakromoleküle mit geeigneten funktionellen Gruppen an einen festen Träger auf kleinsten Oberflächenelementen zu immobilisieren. Hierbei ist es aus Gründen des Erhaltes nativer Molekülstrukturen wichtig, daß die Immobilisierungsreaktionen in flüssiger Phase stattfinden können.

Mittels der erfindungsgemäß immobilisierten Biomakromoleküle auf extrem kleinen Oberflächenelementen (Nanobereich) ist die gleichzeitige Durchführung einer großen Zahl von Bioassays wie Immunoassays, Hybridisierungsassays oder Liegand-Rezeptor-Bindungsassays auf effektive Weise möglich.

In einer Weiterbildung der Erfindung erfolgt die Energiezufuhr für die Photoaktivierung der photoaktivierbaren funktionellen Gruppen des Trägers mit Verfahren der Rastersonden- und optischen Nahfeldmikroskopie. Mit den damit erreichbaren lokalen Lichteinstrahlungen im Nahfeldbereich ist es möglich, durch die nun erreichbare direkte Adressierung der zu Molekülimmobilisierung vorgesehene Bereiche der Oberfläche der festen Phase extrem miniaturisierte Immobilisierungsbereiche zu schaffen. Mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens ist es möglich, für die immobilisierten Biomakromoleküle bisher noch nicht erreichte Packungsdichten für die diskrete flächenmäßige Anordnung zu erreichen.

Anhand von beispielhaften Zeichnungen wird die Erfindung näher erläutert, ohne sie darauf zu beschränken. Es zeigen

Fig. 1 eine Vorrichtung zur Immobilisierung im Nahfeldbereich,
Fig. 2 eine schematische Darstellung einer Matrize in Draufsicht,
Fig. 3 eine schematische Darstellung einer Immobilisierungsvorrichtung,
Fig. 4 eine schematische Darstellung einer Probenzufuhr,
Fig. 5 eine schematische Darstellung einer lichtinduzierten Immobilisierung unter Verwendung der Matrize gemäß Fig. 2,
Fig. 6 - 9 eine schematische Darstellung der Herstellung extrem miniaturisierter Oberflächenelemente.

In Fig. 1 ist eine Nahfeldlichtquelle 6 auf einen Immobilisierungsbereich 9 gerichtet. Der Immobilisierungsbereich 9 wird gebildet durch einen Lichtaustrittskegel 8, dessen Abmaße wiederum durch eine Apertur 7 festgelegt ist. Die Nahfeldlichtquelle 6 befindet sich in einer flüssigen Phase 4, in der die zu immobilisierenden Biomakromoleküle gelöst enthalten sind. Auf einer festen Phase 1 befindet sich eine photoaktivierbare Schicht, deren photoaktivierbare funktionelle Gruppen 3 in die flüssige Phase 4 gerichtet sind. Nahfeldlichtquelle 6, flüssige Phase 4 einschließlich der zu immobilisierende Biomakromoleküle sowie die feste Phase 1 sind in einer lichdurchlässigen, hier nicht dargestellten Durchflußküvette angeordnet.

15

In Fig. 3 ist eine weitere Vorrichtung zur miniaturisierten Immobilisierung von Biomakromolekülen dargestellt. Diese Vorrichtung besteht aus einer durchsichtigen Platte 22, auf der auf an sich bekannte Weise eine Schicht 23 mit photoaktivierbaren funktionellen Gruppen aufgebracht ist. Die durchsichtige Platte 22 weist durchgehende hohle Kanäle 24 auf. Auf der Schicht 23 ist eine auf- und absetzbare Matrize 20 angeordnet. Diese Matrize 20, die in Fig. 2 in Draufsicht dargestellt ist, weist durchgehende Hohlräume 21 auf. Das Anordnungsmuster der Hohlräume 21, der Matrize 20, der Kanäle 24 und der Platte 22 sind identisch. Der Durchmesser der Kanäle 24 ist sehr viel kleiner als der Durchmesser der Hohlräume 21. Zur Herstellung der Matrize 20 werden in ein Siliciumsubstrat der Dicke 400-500 μm mit Hilfe eines Ätzverfahrens die durchgehenden Hohlräume 21 eingebracht. In die Hohlräume 21 werden mit Hilfe eines Überdruckes die gelösten zu immobilisierenden Biomakromoleküle programmiert eingefüllt. Das Einfüllen der Lösung 26 erfolgt über eine Kanüle 25.

Durch Anwendung des Überdruckes wird beim Einfüllen die Luft aus den Hohlräumen 21 durch die Kanäle 24 herausgedrückt. Von der unteren Seite der lichtdurchlässigen Platte 22 erfolgt die Bestrahlung mit Licht bestimmter Wellenlänge und bestimmter Intensität. Die dadurch aktivierten funktionellen Gruppen der Schicht 23 reagieren mit entsprechenden funktionellen Gruppen der sich in der Lösung 26 befindlichen Biomakromolekülen. Danach wird die Matrize 20 von oben mit einer Glasplatte bedeckt und umgekippt. Die Platte 22 mit den darauf immobilisierten Biomakromolekülen 27 wie in Fig. 5 dargestellt, wird von der Matrize 20 abgehoben. Eine weitere beschichtete Platte 22 mit durchgehenden Kanälen 24 wird auf die Matrize 20 aufgesetzt, umgedreht und weitere Lösung 26 von Biomakromolekülen 27 wird in die durchgehenden Hohlräume 21 gegeben. Die Immobilisierung wird auf einer neuen Platte 22 wiederholt.

In den Figuren 6 bis 9 ist der schematische Ablauf der Herstellung sehr kleiner dreidimensionaler Elemente dargestellt. Auf einem Glassubstrat 11 wird ein Photoresist 12 aufgebracht. Auf dem Photoresist 12 wird anschließend eine Siliciumschicht 13 mit bestimmter Dicke aufgedampft. Auf die Siliciumschicht 13 wiederum wird ein zweiter Photoresist 14 aufgetragen. Durch eine Maske 15 mit vorgegebenem Muster und mit bestimmter Auflösung wird der Photoresist 14 belichtet. Alternativ kann dieses Muster auch mittels eines Elektronenstrahles 16 erzeugt werden. Nach dem Abspülen des Photoresist 14 entsteht auf der Oberfläche der Siliciumschicht 13 das entsprechende Muster gemäß Fig. 8. Die Oberfläche wird nun geätzt, zum Beispiel durch Plasmaätzung. Geätzt werden die Zwischenräume 17 bis zum Photoresist 12. Hierbei entstehen dreidimensionale Siliciumformkörper, die nach Beschichtung mit homo- bzw. heterobifunktio-

nellen Verbindungen für Immobilisierungreaktion vorbereitet werden können. Die auf diese Weise hergestellten Oberflächenelemente 18 sind von extremer Kleinheit. Sie lassen sich durch Lösen des Photoresist 12 vom Glassubstrat 11 entfernen. Immobilisierungen können vor dem Ablösen erfolgen. Sie können auch anschließend durchgeführt werden, nachdem die vereinzelten Oberflächenelemente 18 zu neuen adressierbaren Strukturen zusammengesetzt worden sind.

Bezugszeichenliste

1	feste Phase	16	Lichtstrahlung
2	photoaktivierbare Schicht	17	Zwischenräume
3	photoaktivierbare funktionelle Gruppen	18	Oberflächenelement
4	flüssige Phase	19	
5	Flüssig/Gas-Phasengrenze	20	Matrize
6	Nahfeldlichtquelle	21	Hohlräume
7	Apertur	22	Platte
8	Lichtaustrittskugel	23	Schicht
9	Immobilisierungsbereich	24	Kanal
10	Gasphase	25	Kanüle
11	Glassubstrat	26	Lösung
12	Photoresist	27	Biomakromoleküle
13	Siliciumschicht		
14	Photoresist		
15	Maske		

Patentansprüche

- 5 1. Verfahren zur Immobilisierung von Makromolekülen an einer festen Phase durch Photoaktivierung entsprechender funktioneller Gruppen der festen Phase und Kopplung an reaktionsfähige Gruppen der in Lösung befindlichen Biomakromoleküle an die feste Phase,
10 dadurch gekennzeichnet, daß die Photoaktivierung der Immobilisierungsreaktion durch Miniaturisierung der Lichteinwirkung auf die Oberfläche der festen Phase durchgeführt wird, wobei eine adressierbare Steuerung der Lichteinwirkung auf die Oberfläche nach vorgegebenem Muster erfolgt.
- 15 2. Verfahren nach Anspruch 1,
20 dadurch gekennzeichnet, daß die Miniaturisierung der Lichteinwirkung durch Miniaturisierung der Einwirkfläche der Lichtstrahlung erfolgt.
- 25 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet, daß die Lichteinwirkung örtlich und/oder zeitlich versetzt durchgeführt wird.
- 30 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet, daß

die Lichteinwirkung mittels einer Nahfeldlichtquelle im Nahfeldbereich erfolgt.

5

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß als Nahfeldlichtquelle an sich bekannte spitze lichtemittierende Sonden eingesetzt werden.

10

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß Sonden aus Quarzglas verwendet werden.

15

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Sondenspitzen im Nahfeldbereich angeordnet werden.

20

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die feste Phase mittels der Z-Bewegung eines Scanners im konstanten Abstand zur Sondenspitze gehalten wird.

25

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß mittels der X-Y-Bewegung des Scanners adressierbare Immobilisierungsbereiche erzeugt werden.

35

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet, daß
die Miniaturisierung der Einwirkfläche der Licht-
strahlung auf der Oberfläche der festen Phase durch
5 Anwendung von Matrizen (20) erfolgt.

5

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet, daß
10 die Miniaturisierung der Einwirkfläche der Licht-
strahlung durch Herstellung extrem kleiner Oberflä-
chenelemente (19) einer festen Phase erfolgt, die
getrennt und adressierbar neu zusammengesetzt wer-
den, wobei die Belichtung vor der Trennung und/oder
15 danach erfolgt.

15

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11,
dadurch gekennzeichnet, daß
als Lichtstrahlung monochromatisches Licht einge-
20 setzt wird.

20

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12,
dadurch gekennzeichnet, daß
25 als Lichtstrahlung UV-Licht eingesetzt wird.

25

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13,
dadurch gekennzeichnet, daß
30 als Lichtstrahlung monochromatisches Licht mit ei-
ner Wellenlänge zwischen 100 und 500 nm eingesetzt
wird.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14,
dadurch gekennzeichnet, daß
als feste Phase Substrate wie Glimmer, Glimmer mit
5 Goldschicht, weitere Goldoberflächen, Siliciumwafer,
Glasoberflächen oder Polymeroberflächen ver-
wendet werden, die chemisch und/oder adsorptiv ge-
bundene Moleküle mit photoaktivierbaren funktionel-
len Gruppen aufweisen.

10

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15,
dadurch gekennzeichnet, daß
zur Kopplung photoaktivierbarer funtioneller Grup-
15 pen an die feste Phase bifunktionelle Moleküle ein-
gesetzt werden.

15

17. Verfahren nach Anspruch 1 oder 16,
20 dadurch gekennzeichnet, daß
zwischen den örtlich und/oder zeitlich versetzten
Lichteinwirkungen zur Immobilisierung von Biomakro-
molekülen weitere Bindungsreaktionen von Biomakro-
molekülen unter Zwischenschaltung von Waschschrit-
25 ten durchgeführt werden.

25

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9 und 12
bis 17,
30 dadurch gekennzeichnet, daß
als Nahfeldlichtquelle ein optisches Nahfeldmikro-
skop eingesetzt wird.

19. Vorrichtung zur Immobilisierung von Makromolekülen auf sehr kleine Oberflächenelemente einer festen Phase, bestehend aus einer Nahfeldlichtquelle (6), deren Lichtaustrittsöffnung (7) im Nahfeldbereich (8) einer festen Phase (1) angeordnet ist, die auf einen Scanner dreidimensional bewegbar gelagert ist, wobei Nahfeldlichtquelle (6) und feste Phase (1) in einer lichundurchlässigen Durchflußküvette angeordnet sind.

10

20. Vorrichtung zur Immobilisierung von Makromolekülen auf sehr kleinen Oberflächenelementen einer festen Phase,

15

bestehend aus einer Kombination einer lichtdurchlässigen Platte (22) mit durchgehenden Kanälen (24), die auf einer Oberfläche eine Beschichtung mit photoaktivierbaren funktionellen Gruppen (23) aufweist und einer Matrize (20) mit durchgehenden Hohlräumen (21), wobei je ein durchgehender Kanal (24) je einem durchgehenden Hohlraum (21) zugeordnet ist.

20

25. Träger für eine photoaktivierbare Immobilisierung von Biomakromolekülen,

bestehend aus mindestens zwei, extrem miniaturisierten, adressierbaren Bereichen lichtreduziert immobilisierter Moleküle.

30

35. Verwendung des Trägers gemäß Anspruch 21 für die Durchführung von Immunoassays oder Hybridisierungsreaktionen.

35

10

6

4

3

2

1

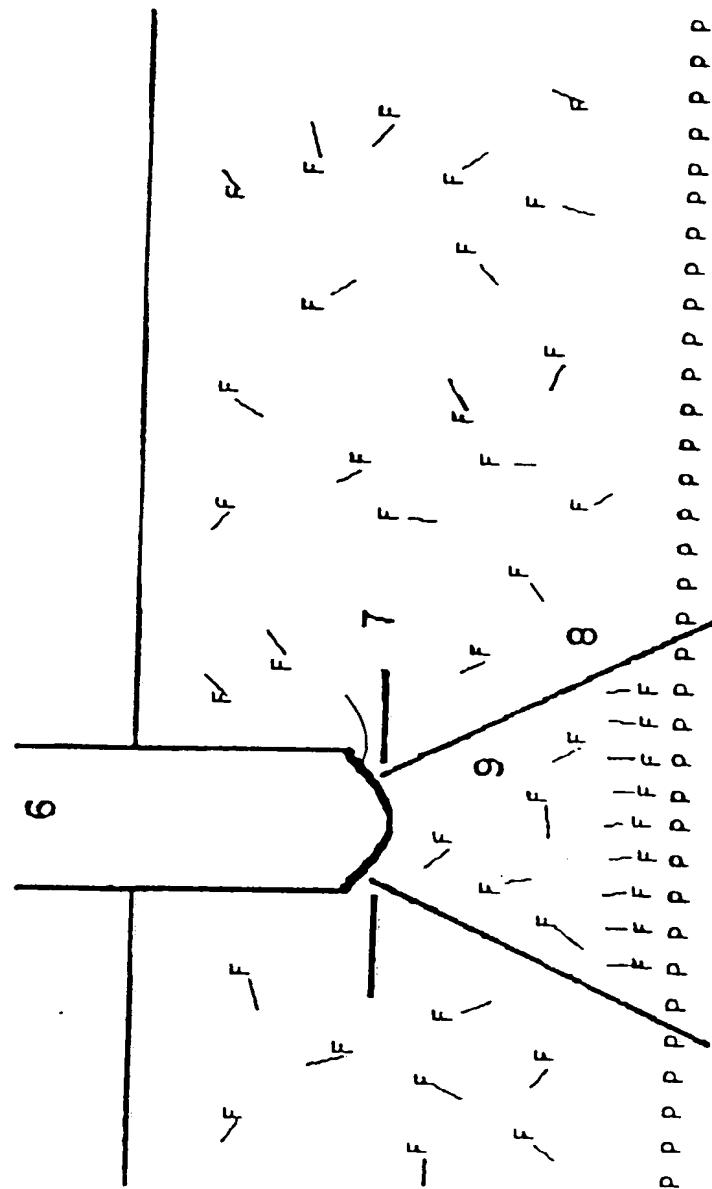


Fig. 1

2/6

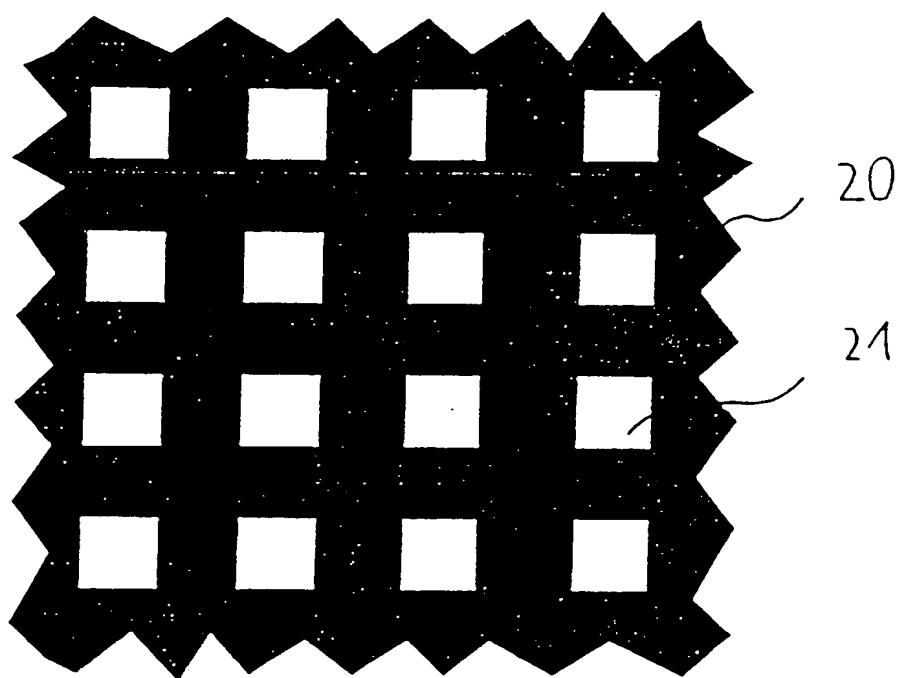
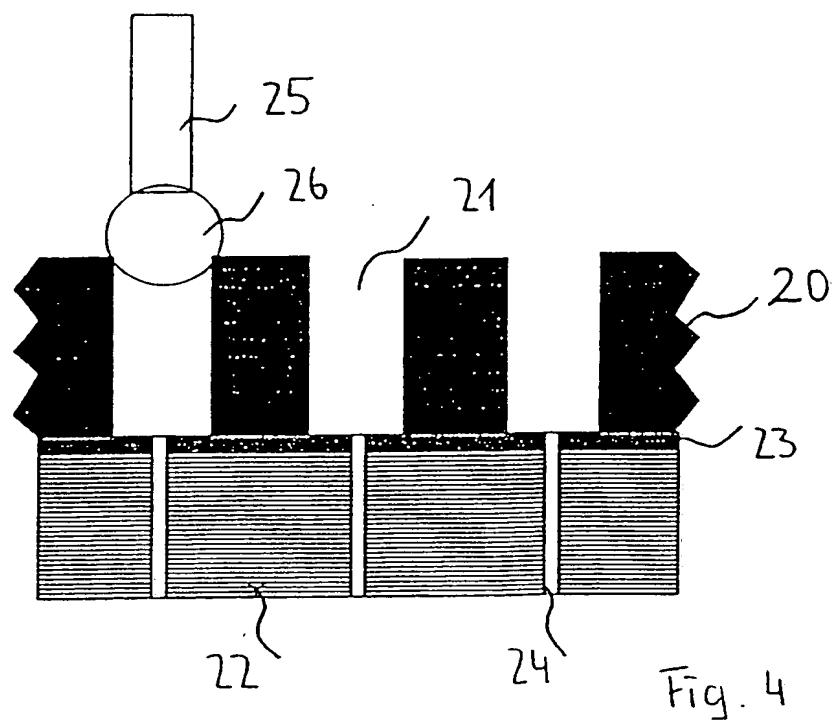
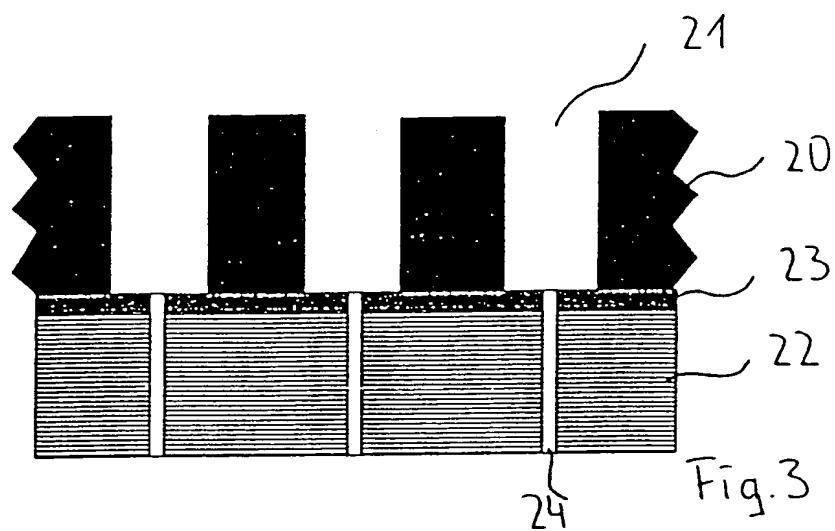
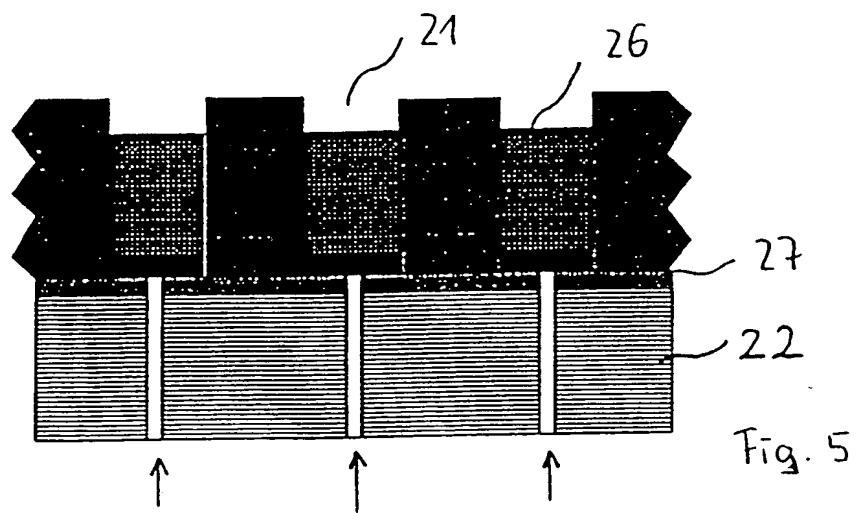


Fig. 2





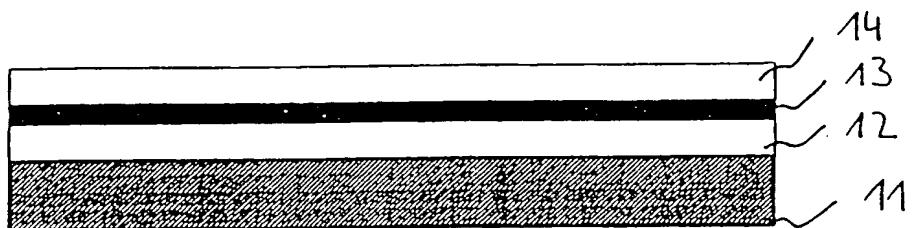


Fig. 6

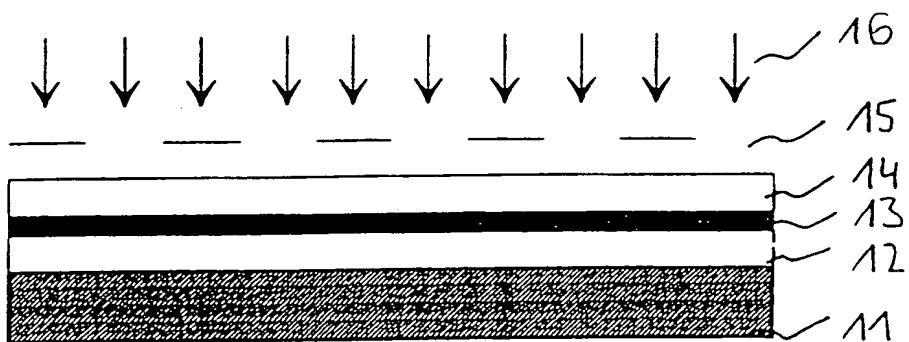


Fig. 7

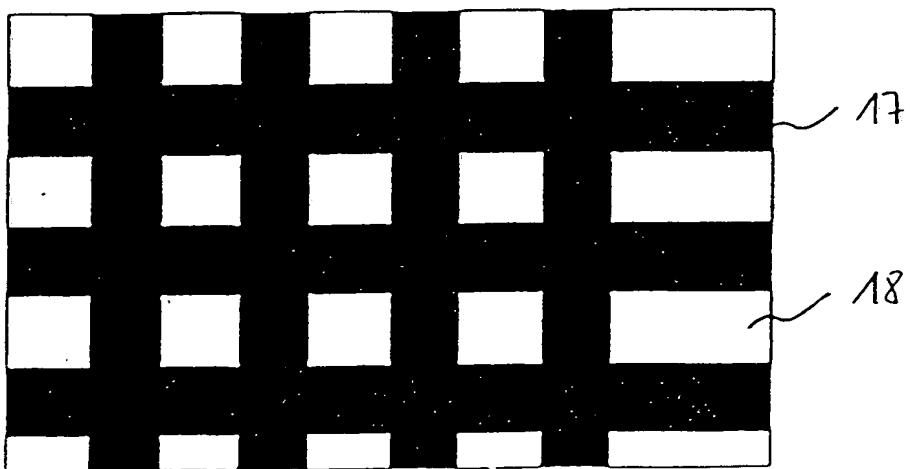


Fig. 8

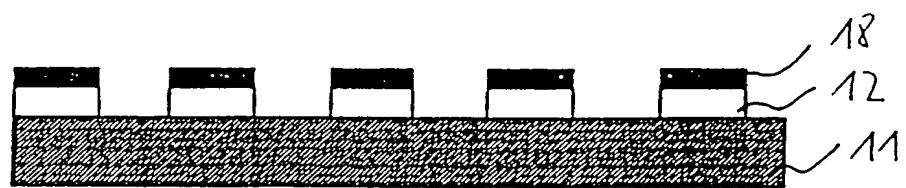


Fig. 9

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation⁶ : G03F 7/00, 7/20		A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/58293 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 23. Dezember 1998 (23.12.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/03657		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 18. Juni 1998 (18.06.98)		(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BIOTOOLS - INSTITUT FÜR COMPUTERINTEGRIERTES BIOENGINEERING GMBH [DE/DE]; Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).	
(30) Prioritätsdaten: 197 26 634.7 18. Juni 1997 (18.06.97) DE		(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BRETER, Holger [DE/DE]; Falkenberger Chaussee 46, D-13053 Berlin (DE). JENTSCH, Winfried [DE/DE]; Weißenseer Weg 8, D-10367 Berlin (DE).	
(74) Anwälte: GULDE, Klaus, W. usw.; Lützowplatz 11-13, D-10785 Berlin (DE).		(73) Veröffentlichung <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 15. April 1999 (15.04.99)	

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR IMMOBILIZING MACROMOLECULES**(54) Bezeichnung:** VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR IMMOBILISIERUNG VON MAKROMOLEKÜLEN**(57) Abstract**

The invention relates to a method and a device for immobilizing macromolecules according to the generic part of claims 1 and 19, 20, 21 and 22. The aim of the invention is to enable light induced, addressable immobilization of bio-macromolecules on extremely small surface elements. This is done by immobilizing macromolecules on a solid phase involving photoactivation of corresponding functional groups of the solid phase and coupling of reaction-capable groups of bio-macromolecules contained in a solution and the solid phase. The invention is characterized in that the immobilization reaction is photoactivated by miniaturizing the effect of the light on the surface of the solid phase, whereby addressable control of the effect of the light on the surface occurs according to a given model.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Immobilisierung von Makromolekülen gemäß den Oberbegriffen der Ansprüche 1 und 19, 20, 21 und 22. Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, lichtinduzierte adressierbare Immobilisierungen von Biomakromolekülen auf extrem kleinen Oberflächenelementen zu ermöglichen. Die Lösung der Aufgabe erfolgt mit einer Immobilisierung von Makromolekülen an eine feste Phase durch Photoaktivierung entsprechender funktioneller Gruppen der festen Phase und Kopplung an reaktionsfähige Gruppen der in Lösung befindlichen Biomakromoleküle an die feste Phase, dadurch gekennzeichnet, daß die Photoaktivierung der Immobilisierungsreaktion durch Miniaturisierung der Lichteinwirkung auf die Oberfläche der festen Phase durchgeführt wird, wobei eine adressierbare Steuerung der Lichteinwirkung auf die Oberfläche nach vorgegebenem Muster erfolgt.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Republik Korea	RO	Rumänien		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SG	Singapur		
EE	Estland	LR	Liberia				

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 98/03657

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 6 G03F7/00 G03F7/20

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 IPC 6 G03F

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96 33971 A (US HEALTH) 31 October 1996	1-3, 10-16, 21,22
Y	see page 10, line 12 - line 24 see page 27, line 5 - line 22 see page 19, line 7 - page 22, line 2 ---	4-9,18
X	SIGRIST H ET AL: "SURFACE IMMOBILIZATION OF BIOMOLECULES BY LIGHT" OPTICAL ENGINEERING, vol. 34, no. 8, 1 August 1995, pages 2339-2348, XP000518229 see the whole document ---	1-3
Y	EP 0 419 369 A (SPIRAL RECH & DEV) 27 March 1991 see the whole document ---	4-9,18
		-/-



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- °A° document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- °E° earlier document but published on or after the international filing date
- °L° document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- °O° document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- °P° document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- °T° later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- °X° document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- °Y° document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- °&° document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 November 1998

Date of mailing of the international search report

11.02.1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl.
 Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

HAENISCH U.P.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l. Appl. No.

PCT/EP 98/03657

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
A	KRAUSCH G ET AL: "Surface modification in the optical near field" MICROELECTRONIC ENGINEERING, vol. 32, no. 1, September 1996, page 219-228 XP004013435 --- "UTILIZING OPTICAL LITHOGRAPHY IN THE SUB-MICRON DIMENSIONAL REGIME" IBM TECHNICAL DISCLOSURE BULLETIN, vol. 33, no. 5, 1 October 1990, page 187/188 XP000107428 --- EP 0 175 973 A (ORGANOGEN MED MOLE BIO FORSCH) 2 April 1986 cited in the application -----	
A		
A		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 98/03657

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See further information

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-19, 21, 22

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 98/03657

The International Searching Authority has found that this international application contains multiple inventions, as follows:

1. Claims Nos. 1-19, 21,22

Immobilization of bio/macromolecules by means of selective activation of structures which can be photoactivated on a substrate using microlithographic techniques.

2. Claim No. 20

Immobilization of macromolecules inside three-dimensional microstructures, whereby the individual structures are provided with microchannels running through the substrate. (The aim is to facilitate penetration of structures by the micromolecules whereby the inert liquid phase is discharged through these microchannels).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. Search Application No

PCT/EP 98/03657

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9633971	A 31-10-1996	US 5736257 A		07-04-1998
		US 5847019 A		08-12-1998
EP 0419369	A 27-03-1991	FR 2652423 A		29-03-1991
		AT 165675 T		15-05-1998
		AU 6416890 A		18-04-1991
		CA 2066586 A		23-03-1991
		CN 1052559 A		26-06-1991
		DD 297721 A		16-01-1992
		DE 69032277 D		04-06-1998
		DE 69032277 T		17-12-1998
		FI 921211 A		20-03-1992
		WO 9104513 A		04-04-1991
		HU 62100 A		29-03-1993
		JP 5504655 T		15-07-1993
		OA 9538 A		15-11-1992
		US 5384464 A		24-01-1995
EP 0175973	A 02-04-1986	DE 3435744 A		03-04-1986
		AU 585253 B		15-06-1989
		AU 4769085 A		10-04-1986
		CA 1267082 A		27-03-1990
		DK 439885 A, B,		29-03-1986
		JP 1979677 C		17-10-1995
		JP 7011521 B		08-02-1995
		JP 61090060 A		08-05-1986
		US 4716122 A		29-12-1987

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 98/03657

A. Klassifizierung des Anmeldungsgegenstandes
IPK 6 G03F7/00 G03F7/20

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 G03F

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 96 33971 A (US HEALTH) 31. Oktober 1996	1-3, 10-16, 21,22
Y	siehe Seite 10, Zeile 12 - Zeile 24 siehe Seite 27, Zeile 5 - Zeile 22 siehe Seite 19, Zeile 7 - Seite 22, Zeile 2	4-9,18
X	---	1-3
	SIGRIST H ET AL: "SURFACE IMMOBILIZATION OF BIOMOLECULES BY LIGHT" OPTICAL ENGINEERING, Bd. 34, Nr. 8, 1. August 1995, Seiten 2339-2348, XP000518229 siehe das ganze Dokument	
Y	---	4-9,18
	EP 0 419 369 A (SPIRAL RECH & DEV) 27. März 1991 siehe das ganze Dokument	

	-/-	

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

9. November 1998

11.02.1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

HAENISCH U.P.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. Sales Aktenzeichen

PCT/EP 98/03657

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	KRAUSCH G ET AL: "Surface modification in the optical near field" MICROELECTRONIC ENGINEERING, Bd. 32, Nr. 1, September 1996, Seite 219-228 XP004013435 ---	
A	"UTILIZING OPTICAL LITHOGRAPHY IN THE SUB-MICRON DIMENSIONAL REGIME" IBM TECHNICAL DISCLOSURE BULLETIN, Bd. 33, Nr. 5, 1. Oktober 1990, Seite 187/188 XP000107428 ---	
A	EP 0 175 973 A (ORGANOGEN MED MOLE BIO FORSCH) 2. April 1986 in der Anmeldung erwähnt -----	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/03657

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt.

1. Ansprüche Nr. weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. Ansprüche Nr. weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

See further information

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung, diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:
1-19, 21, 22

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt

Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-19 21 22

Immobilisierung von Bio-/Makromolekülen mittels selektiver Aktivierung von photoaktivierbaren Strukturen auf einem Substrat durch Einsatz mikrolithographischer Techniken.

2. Anspruch : 20

Immobilisierung von Makromolekülen innerhalb dreidimensionaler Mikrostrukturen, wobei die einzelnen Strukturen mit das Substrat durchgehenden Mikrokanälen versehen sind.
(Beabsichtigt ist eine erleichterte Eindringung der Makromoleküle in die Strukturen durch Abfluss der inerten flüssigen Phase durch diese Mikrokanäle)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCI, cP 98/03657

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9633971	A	31-10-1996		US 5736257 A		07-04-1998
				US 5847019 A		08-12-1998
EP 0419369	A	27-03-1991		FR 2652423 A		29-03-1991
				AT 165675 T		15-05-1998
				AU 6416890 A		18-04-1991
				CA 2066586 A		23-03-1991
				CN 1052559 A		26-06-1991
				DD 297721 A		16-01-1992
				DE 69032277 D		04-06-1998
				DE 69032277 T		17-12-1998
				FI 921211 A		20-03-1992
				WO 9104513 A		04-04-1991
				HU 62100 A		29-03-1993
				JP 5504655 T		15-07-1993
				OA 9538 A		15-11-1992
				US 5384464 A		24-01-1995
EP 0175973	A	02-04-1986		DE 3435744 A		03-04-1986
				AU 585253 B		15-06-1989
				AU 4769085 A		10-04-1986
				CA 1267082 A		27-03-1990
				DK 439885 A, B,		29-03-1986
				JP 1979677 C		17-10-1995
				JP 7011521 B		08-02-1995
				JP 61090060 A		08-05-1986
				US 4716122 A		29-12-1987